

El マウスの海馬におけるグルタミン酸, γ -アミノ酪酸 及びglial fibrillary acidic protein の 免疫組織化学的研究

岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 (指導: 森 昭胤教授)

徐 文 錫

(平成 5 年11月 9 日受稿)

Key words: El マウス, グルタミン酸, γ -アミノ酪酸, 免疫組織化学, 海馬

緒 言

El マウスは, 1954年国立予防衛生研究所の今泉らが床換え中に, 偶然痙攣発作を起したマウスに着目して選抜育種した純系変異種である¹⁾. 発見当初は ep と呼ばれていたが, 1964年に国際的に El として登録された²⁾. 生後4週齢より一週間に一回ほり上げ刺激やシーソー運動刺激をすると, さらに4週間ごろよりこれらの刺激を与えるだけで容易に発作を起すようになる. 最近, ほり上げ刺激をしなくても尾を掴むだけで発作を起すような感受性の高まった El マウスが増えてきた. 発作の型はすでに詳細に報告されている³⁾. このマウスは発作後も死亡しないこと¹⁾, 取扱いやすいこと, 及びヒトの側頭葉てんかん, あるいは二次全般化複雑部分発作のモデルとみなされている^{4,5)}ことから, 数多くの研究がなされてきた⁶⁾.

El マウスの痙攣発現機構に関しては, アセチルコリン⁶⁻⁹⁾, アンモニア¹⁰⁾, アミノ酸¹¹⁻¹⁴⁾, アミン¹⁵⁻¹⁹⁾, 核酸²⁰⁻²²⁾, 蛋白質²³⁾, ペプチド²⁴⁾及び金属²⁵⁾などの異常が報告されている. 特に興奮性アミノ酸神経伝達物質に関しては, N-メチル-D-アスパラギン酸レセプターの拮抗薬である [(+) -5-methy] -10, 11-dibenzo [a, d] cyclohepten-5, 10-imine maleate (MK-801), 2-amino-5-phosphonopropionic acid 及び 2-

amino-7-phosphonopropionic acid は, El マウスの発作を抑制すること^{26,27)}, El マウスの大脳皮質, 海馬及び小脳のグルタミン及びアスパラギン酸値は痙攣素因のない ddY マウスに比べて高いが, ほり上げ刺激により痙攣がおこるようになったものの安静時には, これらのアミノ酸値は El マウス無処置群に比べて低下することが知られている²⁸⁾. また, El マウスの大脳皮質及び海馬切片からのグルタミン酸の放出量は, ddY マウスに比べて高値であるが, ほり上げ刺激により痙攣が起るようになったものの安静時には, El マウス無処置群に比べ低いこと²⁹⁾, El マウスの大脳皮質からのアスパラギン酸の放出量は ddY マウスに比べ低値であるが, ほり上げ刺激により痙攣が起るようになったものの安静時には, El マウス無処置群に比べてアスパラギン酸の放出量は高値であることが認められている³⁰⁾. さらに, El マウスの痙攣を抑制するジプロピル酢酸は, 海馬からのカリウム依存性及び非依存性のアスパラギン酸の放出を抑制している³¹⁾. 他方, 抑制性のアミノ酸神経伝達物質については, ほり上げ刺激により痙攣が起るようになったものの安静時における El マウスの大脳皮質, 海馬及び線条体の γ -アミノ酪酸値は, El マウス無処置群に比べて, 低値であること²⁸⁾, および, El マウスの大脳皮質と海馬からの γ -アミノ酪酸の放出は El マウス無処置群とほり上げ刺激群との間には有意差はないが,

γ -アミノ酪酸の取り込み量は海馬において低値であることが知られている³²⁾。これらのEIマウスにおける興奮性並びに抑制性アミノ酸の異常は発作発現と密接に関与していることを示唆している。しかしながら、EIマウスのグルタミン酸、 γ -アミノ酸、グリア線維性酸性プロテイン (glial fibrillary acidic protein, GFAP) の局在に関する免疫組織化学的検索は少ない³⁶⁾。

本研究においては、免疫組織化学的方法を用いて、EIマウスの海馬におけるグルタミン酸、 γ -アミノ酪酸及びGFAPの局在について、同週齢のddYマウスと詳細に比較検討し、てんかん原性との関係について検索を行なった。

材 料 と 方 法

1. 実験動物

生後3カ月齢のEIマウス及びddYマウス(雄)を使用した。EIマウスは、実験動物中央研究所(川崎)より、ddYマウスはエスエルシー株式会社(静岡)より購入した。

ddYマウスはEIマウスの母系であり、痙攣素因がないことからEIマウスの対照として使用した。実験動物は12時間明暗サイクルのもとで飼育した。飼料はオリエンタル酵母製(MF)を使用し、水は給水瓶で自由に摂取させた。

2. 試薬

グルタミン酸抗体、 γ -アミノ酪酸抗体は、Chemicon社(米国)より購入し、GFAPはProgen社(米国)より購入した。

3. 免疫組織化学的方法

1) 灌流固定方法

固定液の組成は4% paraformaldehyde 及び0.1% glutaraldehyde solution を含む0.1M phosphate buffer (pH7.4) である。固定液の作製はまず、40gのparaformaldehydeを蒸留水(60℃)に攪拌して溶解し、500mlとした。次いで1N NaOHを3~5滴、白濁が消失するまで加え、さらに25% glutaraldehydeを4.0dl加えた。最後に、0.2M phosphate buffer (pH7.4) 500mlを加えて1000mlにし、最終的には0.1M HClと0.2M NaOHでpH7.4に調整した。

灌流固定法は次のように行なった。まず、エーテルにより動物を麻酔した。開胸は、横隔膜

部付近に横切開を入れ、次に横隔膜を破り、左右肋骨部に縦切開を入れて、胸腔を露出した。大動脈の明示のため、大動脈周囲の胸腺及び軟組織を除去した。次いで縫合糸を大動脈の下に入れ、Oリングをつくり結紮を用意した。左心室尖部を切開し、左心室尖部より大動脈へカニューレを挿入後、縫合糸でカニューレを結紮し、固定した。次いで0.1M phosphate bufferを流入し、右心房を切開し血液を流出させた。全血液の流出を確認後、0.1M phosphate bufferから固定液へ活栓を切り換え、約15~20分間灌流(灌流量8~10ml/min)し、脳を固定した。次いで脳を摘出し、大脳皮質及び海馬部を前頭断方向に3分割し、同一固定液で4℃にて1昼夜浸漬固定した。

2) 光学顕微鏡試料作製方法

常法に従いアルコール系列で脱水後、脳組織をパラフィン包埋した。次いで厚さ約3 μ mのパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡的に観察した。

3) 免疫組織化学的検索方法

切片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素メタノール溶液に30分浸漬し、以下の染色を行なった。

ポリクロナール抗体のグルタミン酸と γ -アミノ酪酸は peroxidase antiperoxidase (PAP) 法を、モノクロナール抗体のGFAPは avidin-biotin complex (ABC) 法を用いた。Table 1に示す一次抗体は4℃で16時間反応させた。二次抗体は30分反応後、PAP複合体またはアビジン-ビオチン複合体を30分室温で反応させた。希釈はすべて0.005Mトリス-塩酸緩衝生理食塩液で行なった(Table 2)。発色基質は、0.001% H₂O₂含有0.02% 3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸塩(0.05Mトリス-塩酸緩衝液pH7.6)を用いた。発色後、Mayerのヘマトキシリンで後染色を行ない、光顕的に観察した。

PAP法とABC法の染色はTable 1に示す方法によった。抗原抗体反応は湿箱中で行ない、アビジン-ビオチン複合体は、反応を行なう30分前に作製した。対照標本は一次抗体を省略して同様に行なった。

結 果

1. グルタミン酸の局在

Fig. 1 に ddY マウス(D)と E1 マウス(E)の海馬領域におけるグルタミン酸免疫陽性細胞を示す。グルタミン酸は錐体細胞層全体に認められ、その強さは E1 マウスに強陽性である。さらに倍率をあげて観察すると、E1 マウスの CA1, CA2, CA3 及び CA4 のグルタミン酸陽性反応は錐体細胞の細胞質に認められ、それらはいずれも ddY マウスに比べて細胞の形が膨らんでいた (Fig. 3)。特に E1 マウスの CA1 においては、細胞と細胞との間に隙間が観察され、また核の形も大きいことが認められた (Fig. 3 E1)。さらに E1 マウスの CA1 の陽性細胞の腹側部 str. radiatum (放射状層) への突起に断裂性が認められた (Fig.

4 E1)。また、E1 マウスの歯状回においてもグルタミン酸陽性細胞数も多くそして核の形は ddY マウスに比べて大きかった (Fig. 5)。

2. γ -アミノ酪酸の局在

Fig. 2 に ddY (D)マウスと E1 マウス(E)の海馬領域における γ -アミノ酪酸免疫陽性細胞を示した (Fig. 5)。両者に陽性反応の差はみられなかった。 γ -アミノ酪酸陽性大細胞が ddY マウスの歯状回の近辺に認められたが、E1 マウスには

Table 2 抗体と希釈率

抗 体	希釈率
グルタミン酸 (Glu)	1 : 100
γ -アミノ酪酸 (GABA)	1 : 100
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	1 : 10

Table 1 免疫組織化学染色法



認められなかった (Fig. 6)。

3. GFAP の局在

Fig. 7 は EI マウス及び ddY マウスの海馬領域における GFAP の免疫陽性細胞を示すが、EI に陽性細胞が増加している。Fig. 8 と Fig. 9 は EI マウス及び ddY マウスの CA1 における GFAP 免疫陽性細胞を示した。明らかに EI マウスの背側部の str. oriens (上昇層) と腹側部の str. radiatum (放射状層) において、ddY マウスに比べて樹枝状の免疫陽性細胞の数の増加が認められた。

考 察

鈴木ら⁵⁾は、2-デオキシグルコースを用いたオートラジオグラフにより、EI マウスの発作の際、大脳皮質、海馬が強く興奮し、視床、中心灰白質、青斑核、不確帯を含む諸間質核、被蓋などの活動が低下することを認め、さらに、不全発作の際に一側性海馬歯状回、海馬台、CA1、CA3 などにまたがる小部分が他に比して異常に興奮することを観察したことから、この部分がてんかん原性焦点であると示唆している。今回著者は、グルタミン酸免疫陽性細胞と γ -アミノ酪酸免疫陽性細胞を特に海馬領域について詳細に検討した。グルタミン酸陽性細胞は CA1、CA2、CA3、CA4 及び歯状回のいずれの部位においても細胞の形が大きく、CA1 の細胞間に隙間が認められた。

海馬領域の形態学的研究について、鈴木ら³³⁾は EI マウスの海馬切片をニッスルまたは HE 染色し、ddY マウスと詳細に比較検討している。それによると、ddY マウスの CA1 及び CA2 の錐体細胞層が整然かつ緊密に配列しているのに対して、EI マウスでは全般に緊密ではなく、乱れて見え、この層が少し広がって見えることを観察している。また、CA1 から CA2 にかけて、CA3 から CA4 や歯状回にかけての細胞群に染色性の低下、不円、不正形といった軽度の萎縮像を認めている。水川ら³⁴⁾は、鍍銀法により EI マウスの海馬領域の細胞構築を ddY マウスと比較している。それによると、EI マウスの CA1 と CA2 の錐体細胞の数が減少しており、個々の細胞からでる突起の数が少なく、十分に発達して

いないことを認めている。さらに、CA3 においては、錐体細胞は CA1 と CA2 に比べてまばらに分布し、突起の形態も異なり、数も少ないことを見いだした。

鈴木ら³³⁾のニッスル染色による EI マウスの海馬領域の錐体細胞の形態と、本研究における EI マウスの海馬領域のグルタミン酸陽性細胞の形態とが似ていた。グルタミン酸は海馬の錐体細胞の興奮伝達物質である。最近のアミノ酸の抗体の出現により、グルタミン酸はほとんどすべての海馬領域の錐体細胞に含有されており、その他アンモン角の各層の非錐体細胞、歯状回、非顆粒細胞にも存在していることが明らかにされている。また、グルタミン酸は顆粒細胞にも存在し、歯状回門には少ない。これらのグルタミン酸を含有する錐体細胞は外側中間野に興奮性の投射をするとされている³⁵⁾。先に、平松ら²⁸⁾は、EI マウスの海馬におけるグルタミン酸量は ddY マウスに比べて高いことを報告している。また、ほうり上げ刺激により痙攣が起きようになったものの安静時では低下し、ddY マウスと同じレベルになることを認めている。小山³⁶⁾はコバルト金属末をラットの大脳皮質に投与して作成したコバルト誘導てんかん焦点野のグルタミン酸を免疫組織学的に染色しているが、それによると、グルタミン酸陽性細胞の数が減少していた。この知見はコバルト焦点部位のグルタミン酸量の低下³⁷⁾と一致している。今回著者の実験結果では、EI マウスの海馬領域のグルタミン酸陽性細胞の数が多かった。これらの結果はてんかんマウスにおいて、けいれんの有無とグルタミン酸量が相関していることを示している。今回の結果から本研究において用いた EI マウスは、ほうり上げ刺激をしないでも容易に痙攣を起すマウスであり、動物の条件は異なるが EI マウスにおいて ddY マウスに比べて明らかに陽性細胞が多いことは平松らの分析報告を支持するものである。

海馬の簞細胞や錐体細胞層の軸索細胞は γ -アミノ酪酸作動性で、錐体細胞に抑制をかけることが知られている。歯状回では顆粒細胞層の 4 つの簞細胞が γ -アミノ酪酸作動性で顆粒細胞に抑制をかける。歯状回門の γ -アミノ酪酸含有細

胞は対側の海馬に交連線維を送るとされている。また γ -アミノ酪酸線維も各層に見られ、アンモン角では錐体細胞層や網状層に、歯状回では顆粒細胞と分子層の外層に多く分布するとされている³⁵⁾。今回は、アミノ酪酸の局在については海馬において差を認めなかったが、ddY マウスの歯状回近辺の放射状層に散在性のアミノ酪酸陽性大細胞を認めた。しかもこの陽性細胞は EI マウスには認められなかった。さらに、EI マウスの無処置群及びほうり上げ刺激により痙攣を起すようになったものの安静時において、大脳皮質と海馬の γ -アミノ酪酸量は ddY マウスに比べて低いことが認められている²⁸⁾。また、発作発射起始時に重要な役割を持つ頭頂皮質の γ -アミノ酪酸濃度とグルタミン酸デカルボキシラーゼの活性が低いことが知られている^{37,38)}。これらの成績は、歯状回付近の γ -アミノ酪酸の細胞の数の減少と一致している可能性もある。

側頭葉てんかんにはアンモン角の硬化が認められる^{39,40)}。本実験においては、EI マウスの CA1 においてグルタミン酸陽性細胞間に隙間が認められ、陽性細胞の放射状層における突起に断裂性が認められた。それに一致して、GFAP 免疫陽性細胞の増加が認められた。この成績は EI マウスが側頭葉てんかんのモデルであることを示している。Brigande et al.⁴¹⁾も同様に、EI マウスの海馬の GFAP 免疫陽性細胞を対照の C57 BL/6J マウスと比較検討している。それによると、EI マウスの海馬の GFAP 免疫陽性細胞はマウスに比べて15~40倍も増加しているが、錐体細胞の脱落は認められていない。また、ほうり上げ刺激をしていない成熟 EI マウスとほうり上げ刺激をし、痙攣を起すようになった EI マウスの海馬の GFAP 免疫陽性細胞は著明に増加しているが、まだ発作を起さない生後43日においては GFAP 免疫陽性細胞は、対照マウスの成熟時と同レベルで非常に少ないことを認めている。このことから、彼らは EI マウスの海馬の GFAP 免疫陽性細胞の増加は発作の結果によるものではないことを指摘している。さらに、鈴木ら³³⁾は、EI マウスの海馬における錐体細胞の不整列は痙攣を一度も起していない EI マウスにも見られることから、この現象は発作の結果

によるものではないことを示唆している。GFAP に関する本研究の免疫組織化学的方法による病理学的所見は、EI マウスの GFAP の局在が遺伝性のてんかん原性と関係する可能性を十分に示唆するものであるが、現在、幼若な痙攣を経験していない EI マウスを用いて検討中である。

結 論

免疫組織化学的方法を用いて、EI マウスの海馬におけるグルタミン酸、 γ -アミノ酪酸及び GFAP 免疫陽性細胞について同週齢の ddY マウスと比較検討した。

1) ddY マウスと EI マウス海馬のグルタミン酸は EI マウスにおいて強い陽性反応を認めた。EI マウスの CA1, CA2, CA3及び CA4のグルタミン酸陽性細胞はいずれも ddY マウスに比べて細胞の形が膨らんでおり、CA1においては細胞間に隙間があり、核も大きかった。また、歯状回においては陽性細胞数も多くそして核の形は大きい。さらに EI マウスの CA1の腹側部放射状層にはグルタミン酸陽性細胞の突起の断裂性が認められた。

2) ddY と EI マウスの γ -アミノ酪酸はほぼ同様の弱陽性を示し、差は認めなかった。しかし、 γ -アミノ酪酸陽性大細胞が ddY マウスの歯状回の付近に認められ、EI マウスには認められなかったことが注目された。

3) EI マウスの背側部と腹側部の GFAP 免疫陽性細胞は、ddY マウスに比べて明らかに増加しており、アンモン角硬化の状況が示唆された。

稿を終るに当たり、御指導、御校閲を賜った森昭胤教授に深甚なる謝意を表すと共に、直接御指導いただいた平松緑講師、免疫組織化学方法を御教授いただいた歯学部永井教之教授及び長塚 仁助教授に深謝致します。

文 献

- 1) 今泉 清, 伊藤昭吾, 沓掛源次郎, 滝沢竜安, 藤原公策, 土川 清: マウスのてんかん様異常について. 実験動物 (1959) **8**, 6-10.
- 2) Imaizumi K and Nakano T: Mutant Stocks, Strain: El. Mouse News Letter (1964) **31**, 57.
- 3) Mori A: El mice: Neurochemical approach to the seizure mechanism. Neurosciences (1988) **14**, 275-285.
- 4) Suzuki J: Peroxysmal discharges in the electroencephalogram of the El mouse. Experientia (1976) **32**, 336-338.
- 5) Suzuki J, Nakamoto Y and Shinkawa Y: Local cerebral glucose utilization in epileptic seizures of the mutant El mouse. Brain Res (1983) **266**, 359-363.
- 6) Fujiwara M: Acetylcholine level of mouse brain in preconvulsive states. Neurosciences (1980) **6**, 192-202.
- 7) Kurokawa M, Machiyama Y and Kato M: Distribution of acetylcholine in the brain during various states of activity. J Neurochem (1963) **10**, 341-348.
- 8) Kurokawa M, Nuruse H and Kato M: Metabolic studies on ep mouse, a special strain with convulsive position. Prog Brain Res (1966) **21A**, 112-130.
- 9) 藤原正昭, 松本路子, 森 昭胤: El 系, CBA 系および A 系マウス脳内アセチルコリン含有量について. 脳研究会誌 (1977) **3**, 124-125.
- 10) Naruse H, Kato M, Kurokawa M, Hara R and Yabe T: Metabolic defects in a convulsive strain of mouse. J Neurochem (1960) **5**, 359-369.
- 11) Suzuki S and Mori A: Regional distribution of tyrosine, tryptophan and their metabolites in the brain of epileptic El mice. Neurochem Res (1992) **17**, 693-698.
- 12) Hattori H, Ito M and Mikawa H: γ -Aminobutyric acid binding sites and γ -aminobutyric acid concentrations in epileptic El mouse brain. Eur J Pharmacol (1985) **119**, 217-223.
- 13) Iwata H, Yamagami S, Lee E, Matsuda T and Baba A: Increase of brain taurine contents of El mice by physiological stimulation. Jpn J Pharmacol (1979) **29**, 503-507.
- 14) Hiramatsu M, Ogawa K, Kabuto H and Mori A: Reduced uptake and release of 5-hydroxytryptamine and taurine in the cerebral cortex of epileptic El mice. Epilepsy Res (1987) **1**, 40-45.
- 15) Hiramatsu M: Brain monoamine levels and El mouse convulsions. Folia Psychiatr Neurol Jpn (1981) **35**, 261-266.
- 16) Hiramatsu M: Brain 5-hydroxytryptamine level, metabolism, and binding in El mice. Neurochem Res (1983) **8**, 1163-1175.
- 17) Hiramatsu M and Mori A: Brain catecholamine concentrations and convulsion in El mice. Folia Psychiatr Neurol Jpn (1977) **31**, 492-495.
- 18) Hiramatsu M and Mori A: Distribution of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in brains of El and ddY mice. IRCS Med Sci (1977) **8**, 84.
- 19) Hiramatsu M and Mori A: El mouse seizure and 5-hydroxytryptamine in the brain. IRCS Med Sci (1980) **8**, 719-720.
- 20) Yamagami S, Ohno K, Tsuji M, Mori K and Kawakita Y: Developmental alteration in RNA metabolism of El mouse brain. Folia Psychiatr Neurol Jpn **35**, 253-260.
- 21) Onishi H, Yamagami S, Mori K and Kawakita Y: Effect of convulsions on the synthesis of

- heterogenous nuclear RNA associated with polyadenylate and oligoadenylate sequences from El mouse brain as a convulsive strain. *Exp Neurol* (1984) **83**, 98—107.
- 22) Yamagami S, Onishi H, Ohno K, Mori K and Kawakami Y : Alteration of RNA synthesis in vivo in intact cerebral cortex nuclei induced by convulsions in seizure susceptible El mice. *Exp Neurol* (1987) **95**, 167—177.
 - 23) Mody I, Baimbridge K G and Miller J J : Distribution of calbindin-D_{28K} (CaBP) in the cerebral cortex and hippocampus of the epileptic (El) mouse. *Epilepsy Res* (1987) **1**, 46—52.
 - 24) Ochi J, Ito M, Okuno T and Mikawa H : Immunoreactive leucine-enkephalin content in brains of epileptic El mice. *Epilepsia* (1988) **29**, 91—96.
 - 25) Fukahori M, Itoh M, Oomagari K and Kawasaki H : Zinc content in discrete hippocampal and amygdaloid areas of the epilepsy (El) mouse and normal mice. *Brain Res* (1988) **455**, 381—384.
 - 26) Sato K, Morimoto K, Hiramatsu M, Mori A and Otsuki S : Effect of noncompetitive agonist (MK-801) of NMDA receptors on convulsions and brain amino acid level in El mice. *Neurochem Res* (1989) **14**, 741—744.
 - 27) Shimada M, Kabuto H and Yokoi I : The effect of ω -phosphono- α -aminocarboxylic acids on seizures and brain amino acid levels in El mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* (1987) **57**, 359—373.
 - 28) Hiramatsu M, Edamatsu R, Suzuki S, Shimada M and Mori A : Regional excitatory and inhibitory amino acid levels in epileptic El mouse brain. *Neurochem Res* (1990) **15**, 821—825.
 - 29) Osaki Y, Hiramatsu M and Mori A : Uptake and K⁺-stimulated release of glutamate from cerebral cortical and hippocampal slices in El mice, and dose effect of glutamate. *Neurosciences* (1990) **16**, 561—567.
 - 30) Higashihara Y, Hiramatsu M and Mori A : Aspartic acid release from cerebral cortical slices of El mice with high seizure susceptibility. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* (1990) **70**, 155—171.
 - 31) Hiramatsu M, Kinno I, Kanakura K, Sato K and Mori A : Increased aspartate release from brain slices of epileptic experimental animals and effect of valproate on it. *Jpn J Psychiatr Neurol* (1992) **46**, 541—543.
 - 32) Janjua NA, Mori A and Hiramatsu M : Gamma-aminobutyric acid uptake is decreased in the hippocampus in a genetic model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* (1991) **8**, 71—74.
 - 33) 鈴木二郎, 松下正明, 中本百合江 : El マウス脳の病理組織学的研究, 厚生省神経疾患研究委託費「てんかんの成因と治療に関する研究」(#82-01). 昭和57年度報告書 (1982) pp 27—33.
 - 34) 水川公直, 平松 緑, 森 昭胤 : El マウス海馬領域における鍍銀法による細胞構築学的研究. *Neurosciences* (1989) **14**, 204—206.
 - 35) 篠田 晃 : 海馬 ; 化学的神経機能解剖学, 遠山正彌, 塩谷弥兵衛編, 厚生社, 大阪 (1987) pp 302—312.
 - 36) Koyama I : Amino acids in the cobalt-induced epileptogenic and non epileptogenic cat's cortex. *Can J Physiol Pharmacol* (1972) **50**, 740—752.
 - 37) Murashima YL, Kasamo K and Suzuki J : Distribution of GABA concentrations and GAD activities in the parietal cortex and hippocampal CA1 in the El mouse. *Jpn J Psychiatry Neurol* (1990) **44**, 442—444.
 - 38) 村島善也, 笠松公弘, 鈴木二郎 : 難治てんかんの成因に関わる発達生化学的研究—発達過程における El マウス頭頂皮質 GABA 作動系異常領域の成熟と形成, 厚生省精神・神経疾患研究委託費 (元指—1) 難治てんかんの病態と治療に関する研究. 平成元年度研究報告書 (1990) pp 23—31.
 - 39) Scheibel AB : Morphological correlates of epilepsy : cells in the hippocampus ; in *Antiepileptic*

- Drugs : Mechanisms of Action, Glaser GH, Penry JK and Woodbury DM eds, Raven Press, New York (1980) pp 49—62.
- 40) Babb TL and Brown WJ : Pathological findings in epilepsy ; in Surgical Treatment of the Epilepsies, Engel J Jr ed, Raven Press, New York (1987) pp 101—114.
- 41) Brigande JV, Wieraszko A, Albert MD, Balkema GW and Seyfried TN : Biochemical correlates of epilepsy in the El mouse : Analysis of glial fibrillary acidic protein and gangliosids. *J Neurochem* (1992) **58**, 752—760.

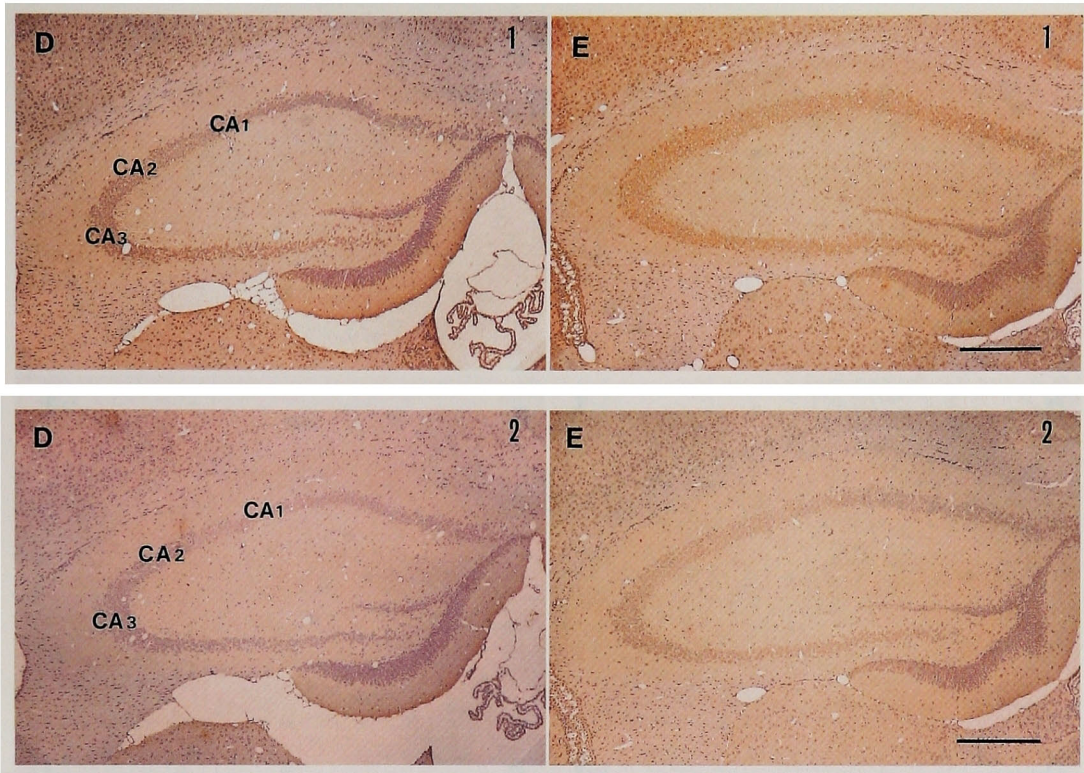


Fig. 1 The distribution of glutamic acid positive cells in the hippocampus of ddY (D) and EI (E) mice. $\times 25$ bar = $400\mu\text{m}$

Fig. 2 The distribution of γ -aminobutylic acid positive cells in the hippocampus of ddY (D) and EI (E) mice. $\times 25$ bar = $400\mu\text{m}$

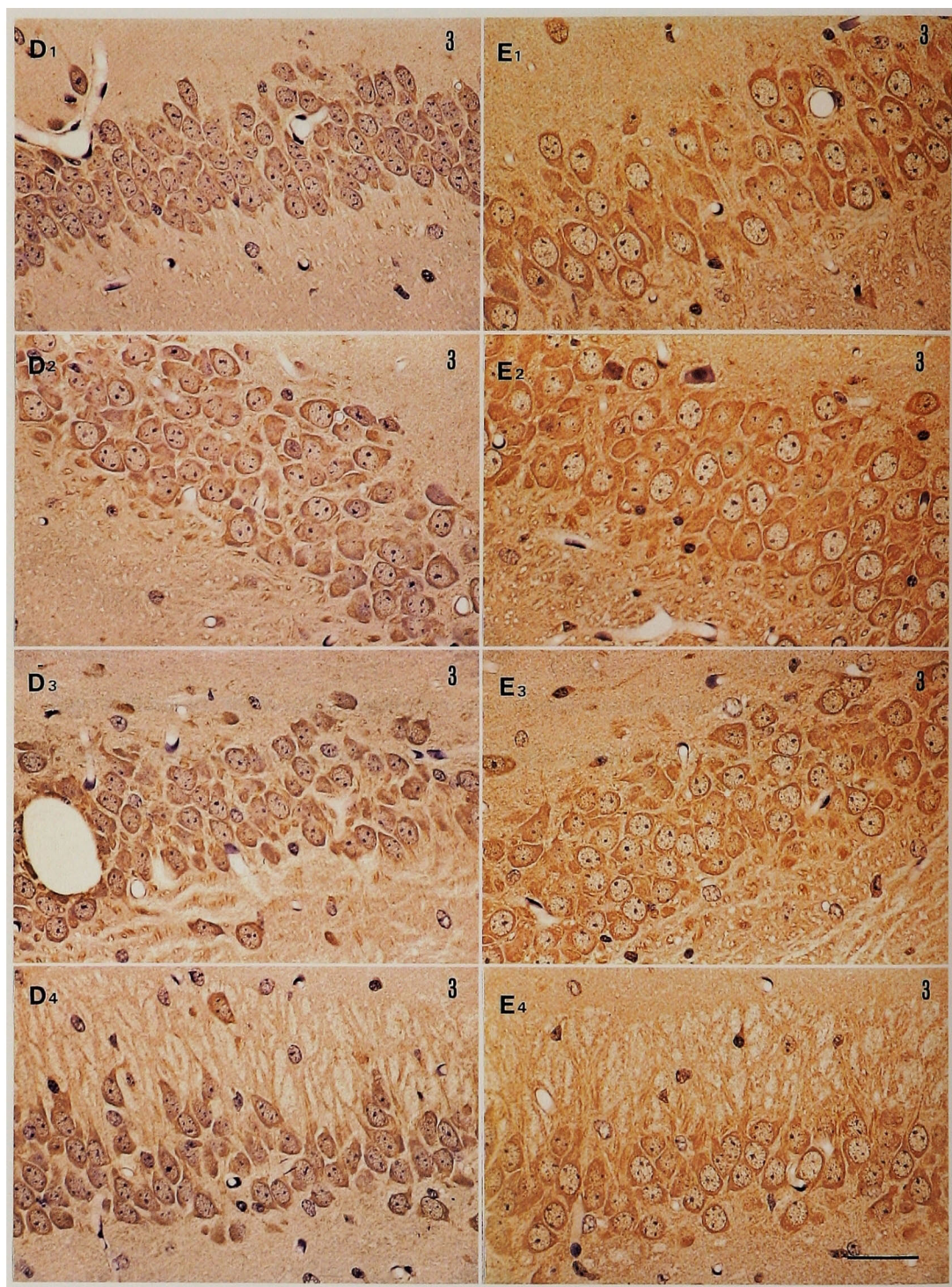


Fig. 3 The distribution of glutamic acid positive cells in CA1, CA2, CA3 and CA4 of ddY and El mice. (D1~D4, E1~E4) $\times 260$ bar = $40\mu\text{m}$

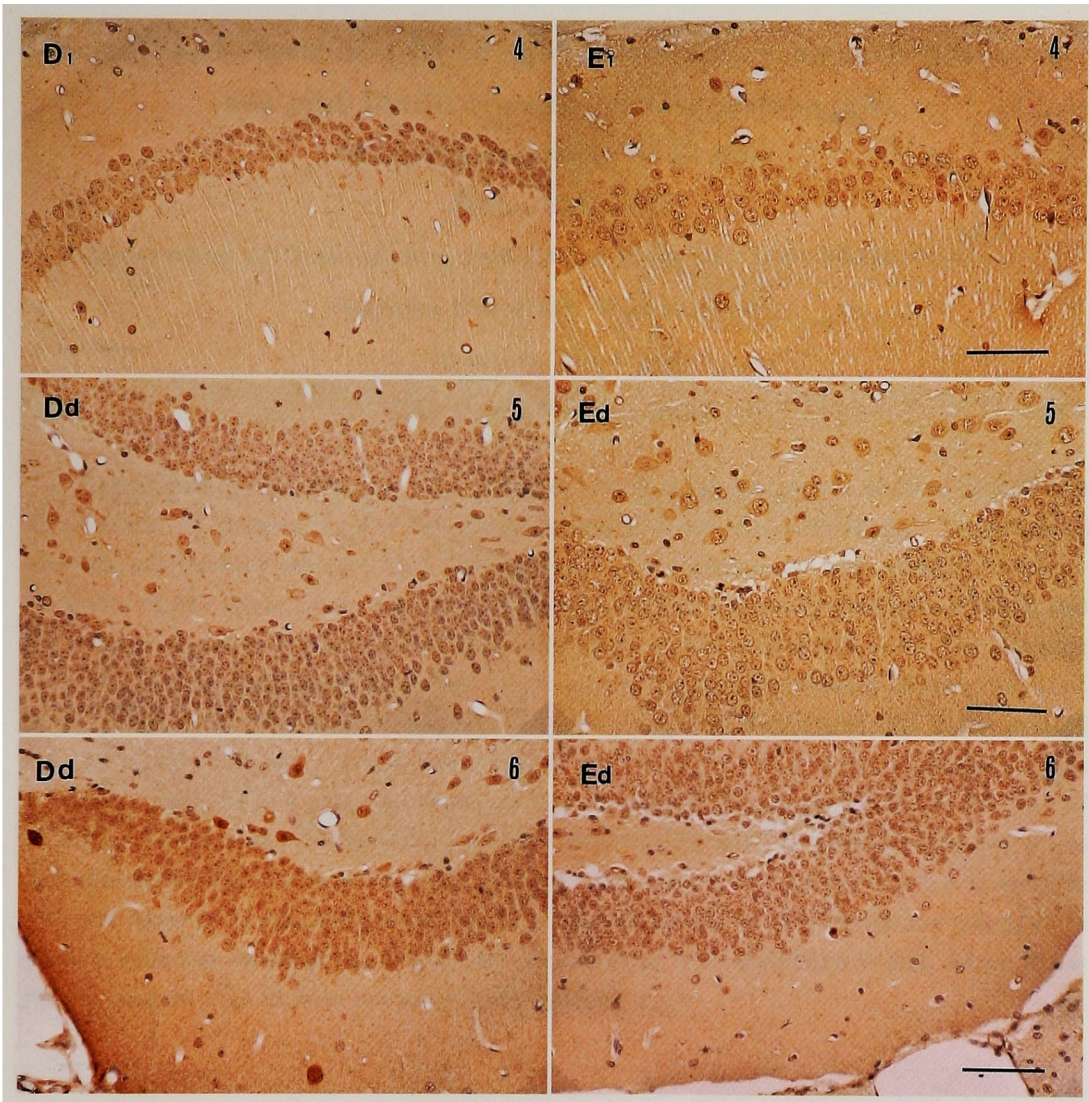


Fig. 4 The distribution of glutamic acid positive cells in CA1 (left) (right) of ddY(D1) and El(E1) mice. $\times 120$ bar = $100\mu\text{m}$

Fig. 5 The distribution of glutamic acid positive cells in the gyrus dentatus of ddY(Da) and El(Ed) mice. $\times 120$ bar = $100\mu\text{m}$

Fig. 6 The distribution of γ -aminobutyric acid (GABA) positive cells in gyrus dentatus ddY(Dd) and El (Ed) mice. $\times 120$ bar = $100\mu\text{m}$

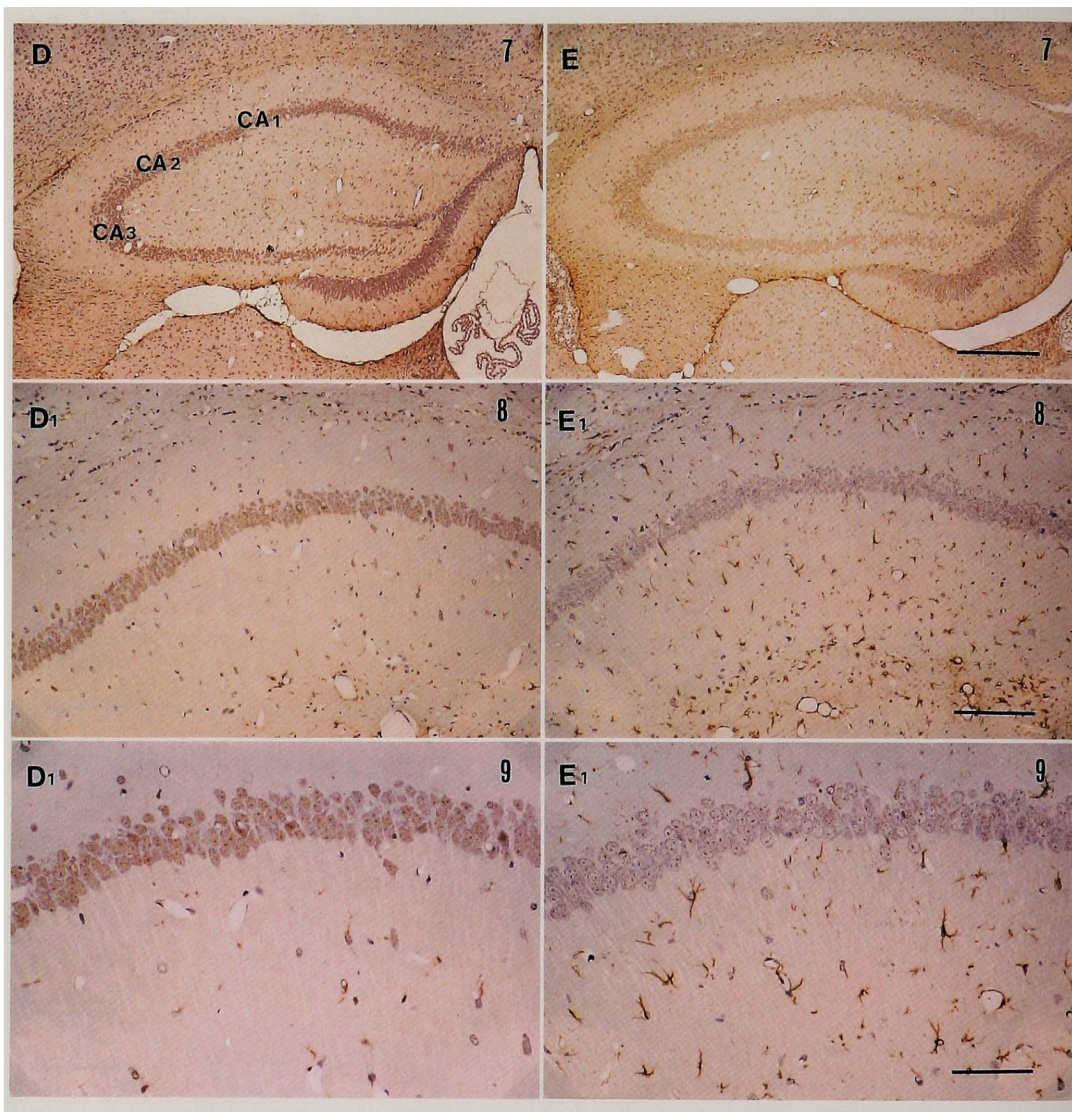


Fig. 7 The distribution of glial fibrillary acidic protein positive cells in the hippocampus of ddY(D1) and El(E1) mice. $\times 25$ bar = $400\mu\text{m}$

Fig. 8 (a, b, c, d,) The distribution of glial fibrillary acidic protein positive cells in CA1 of ddY(D1) and El(E1) mice. $\times 60$ bar = $200\mu\text{m}$

Fig. 9 The distribution of glial fibrillary acidic protein positive cells (Enlargement of Fig. 8. ddY(D1) and El(E1) $\times 120$ bar = $100\mu\text{m}$

**Immunohistochemical analysis of glutamic acid, γ -aminobutyric acid,
and glial fibrillary acidic protein positive cells
in the hippocampus of El mice**

Moon-Suk SUH

Department of Neuroscience, Institute of Molecular and Cellular Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. A. Mori)

Glutamic acid, γ -aminobutyric acid and glial fibrillary acidic protein positive cells in the hippocampus of El mice and ddY mice were examined immunohistochemically. The shape of glutamic acid positive cells in CA1, CA2, CA3 and CA4 of hippocampus were expanded compared to that of ddY mice. There was a space between cells and cells containing glutamic acid and the nucleus of such cells was larger in the CA1 of El mice than that of ddY mice. The glutamic acid cells were irregular and the nucleus was larger in the gyrus dentatus of El mice than that of ddY mice. There was an intermittence in the process of glutamic acid cells in the area of str. radiatum of El mice. γ -Aminobutyric acid-positive cells seemed to be expanded in CA1, CA2, CA3, and CA4 and gyrus dentatus and there was space between such cells in the CA1 of El mice. Large γ -aminobutyric acid positive cells, which were located close to the gyrus dentatus in ddY mice, were not found in El mice. The number of γ -aminobutyric acid-positive cells was lower in El mice than in ddY mice. A greater number of glial fibrillary acidic protein positive cells was found in the area of the hippocampus in El mice than in ddY mice. These results suggest that El mice are genetically epileptic mice.